

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-323560

(43)Date of publication of application : 12.11.1992

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 33/553

(21)Application number : 03-090852

(22)Date of filing : 22.04.1991

(71)Applicant : NIPPON TELEGR & TELEPH CORP <NTT>

(72)Inventor : SHIBATA SHUICHI
FUJIWARA KOICHI
ARISHIMA KOICHI
HOSHINO MITSUTOSHI
MIZUTANI HIROKO

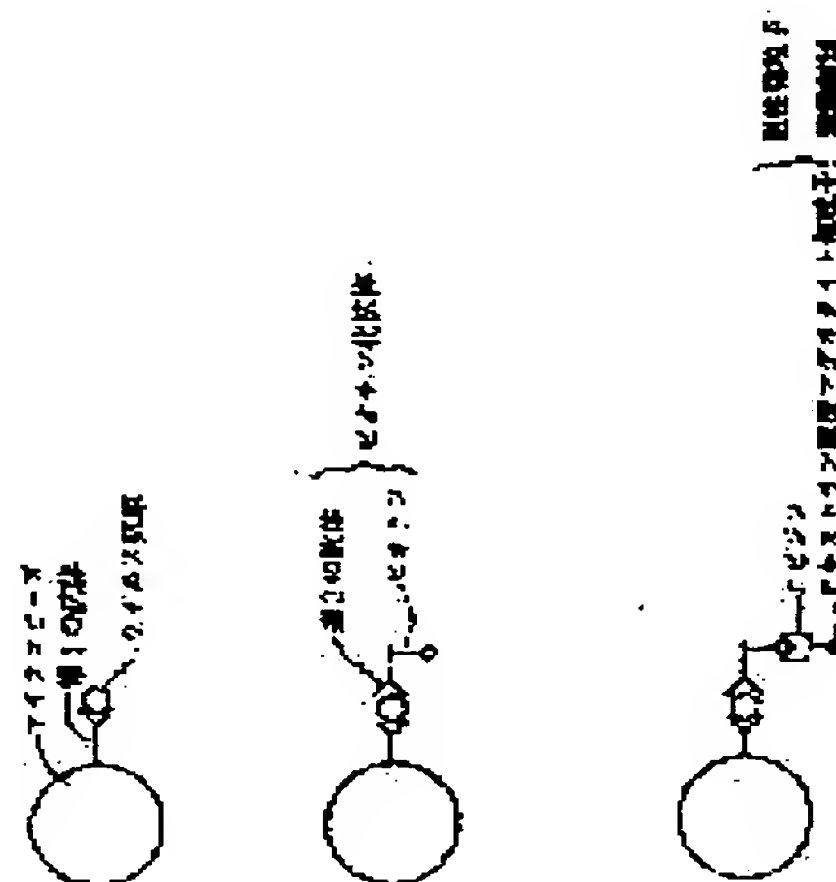
(54) MAGNETIC PARTICLE LABELLING MATERIAL FOR USE IN LASER MAGNETIC IMMUNITY MEASUREMENT AND ADJUSTING METHOD FOR SUBJECT

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a magnetic particle labelling material causing little non-singular reaction and a method of adjusting a subject in order to reduce and stabilize the controlled values of the material which pose problems when the material is actually applied in patient blood serum.

CONSTITUTION: In magnetite particulates covered with dextran, a plurality of biotins are bonded to the surface of the dextran and avidin is bonded to other plural biotines. Because a subject is magnetically labelled through an avidin-biotin reaction, the time required for the reaction can be greatly shortened in comparison with when the subject is magnetically labelled through an antigen-antibody reaction.

Application of the avidin-biotin reaction in a magnetically labelling reagent enhances not only the sensitivity of detection but also the stability of the reagent.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-323560

(43) 公開日 平成4年(1992)11月12日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	E	7906-2 J		
33/553		9015-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平3-90852	(71) 出願人	000004226 日本電信電話株式会社 東京都千代田区内幸町一丁目1番6号
(22) 出願日	平成3年(1991)4月22日	(72) 発明者	柴田 修一 東京都千代田区内幸町一丁目1番6号 日 本電信電話株式会社内
特許法第30条第1項適用申請有り 平成2年11月12日 財団法人日本ウイルス学会発行の「第38回日本ウイルス 学会総会演説抄録」に発表		(72) 発明者	藤原 幸一 東京都千代田区内幸町一丁目1番6号 日 本電信電話株式会社内
		(72) 発明者	有島 功一 東京都千代田区内幸町一丁目1番6号 日 本電信電話株式会社内
		(74) 代理人	弁理士 志賀 正武

最終頁に続く

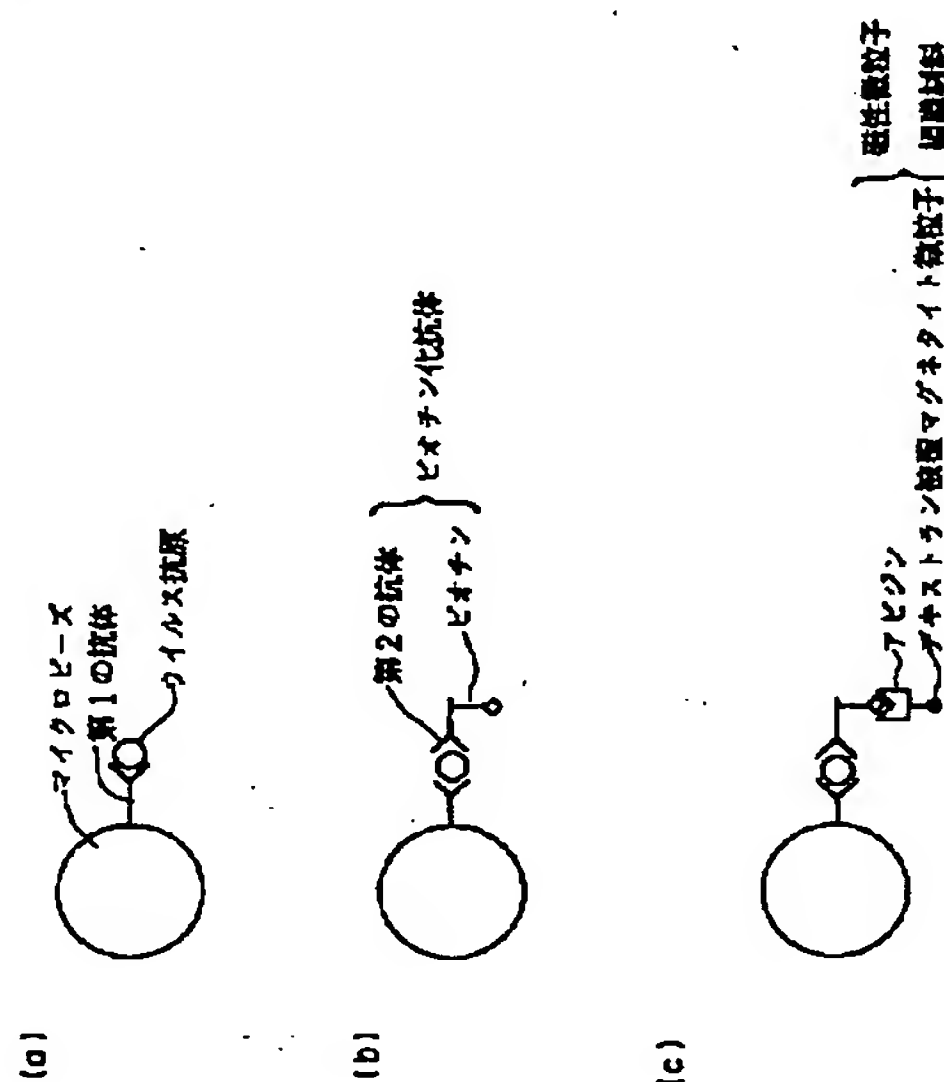
(54) 【発明の名称】 レーザ磁気免疫測定に用いられる磁性微粒子標識材料及びに検体調整方法

(57) 【要約】

【目的】 実際に患者血清に適用する際に問題となる、コントロール値の低減と安定化を図るために、非特異反応の少ない磁性微粒子標識材料及び検体調整法を提供する。

【構成】 デキストランが被覆されたマグネタイト微粒子において、複数のビオチンを該デキストランの表面に結合させ、さらに該複数のビオチンにアビジンを結合させる。

【効果】 アビジン-ビオチン反応で検体が磁気標識されるから、従来の抗原抗体反応で磁気標識される場合よりも反応時間が大幅に短縮できる。アビジン-ビオチン反応を磁気標識試薬に適用したので、検出感度の向上のみならず試薬の安定性の向上も併せて図れる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 デキストランが被覆されたマグネタイト微粒子であって、複数のアビジンが該デキストランの表面に結合していることを特徴とするレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子標識材料。

【請求項2】 デキストランが被覆されたマグネタイト微粒子であって、複数のビオチンが該デキストランの表面に結合していることを特徴とするレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子標識材料。

【請求項3】 請求項2に記載の磁性微粒子標識材料であって、該ビオチンにアビジンが結合されていることを特徴とするレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子標識材料。

【請求項4】 検出すべき抗原に対する第一の特異抗体が予め結合されたマイクロビーズ浮遊液と、検体とを反応させ、該マイクロビーズ表面に検体を捕捉せしめる第一工程と、捕捉された該検体と、予めビオチンを結合した該検体に対する第二の特異抗体とを更に反応させ、該検体を第一と第二の特異抗体とでサンドイッチする第二工程と、該第二工程後に、前記請求項1, 2, 3のいずれかに記載の磁性微粒子標識材料の分散浮遊液を加え、前記第二の特異抗体中のビオチンと、該磁性微粒子標識材料中のアビジンとを反応させ、該マイクロビーズに捕捉された該検体のみを磁気標識する第三工程と、該第三工程において反応しなかった該磁性微粒子標識材料を分離・除去する第四工程とを少なくとも含むことを特徴とする検体調整方法。

【請求項5】 検出すべき抗原に対する第一の特異抗体が予め結合されたマイクロビーズ浮遊液と、検体とを反応させ、該マイクロビーズ表面に検体を捕捉せしめる第一工程と、捕捉された該検体と、予めビオチンを結合した該検体に対する第二の特異抗体とを更に反応させ、該検体を第一と第二の特異抗体とでサンドイッチする第二工程と、該第二工程後に、アビジンを単独で加え、第二の特異抗体に結合しているビオチンにアビジンを結合させ、さらにこの第二の特異抗体中のビオチンに結合したアビジンと、前記請求項2に記載の磁性微粒子標識材料中のビオチンとを反応させ、該マイクロビーズに捕捉された該検体のみを磁気標識する第三工程と、該第三工程において反応しなかった該磁性微粒子標識材料を分離・除去する第四工程とを少なくとも含むことを特徴とする検体調整方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、抗原抗体反応を利用した免疫検査法に関するものである。更に詳しくは、先に本発明者らが発明したレーザ磁気免疫測定法に用いられる標識材料及び検体調整方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 後天性免疫不全症候群、成人T細胞白血病等のような新型ウイルス性疾患、あるいは各種ガンの

早期検査法として、抗原抗体反応を利用した免疫測定法の開発が、現在、世界的規模で推進されている。

【0003】 従来から知られる微量免疫測定法としては、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素イムノアッセイ(EIA)、蛍光イムノアッセイ(FIA)法等が既に実用化されている。これらの方法は、それぞれアイソトープ、酵素、蛍光物質を標識として付加した抗原または抗体を用い、これと特異的に反応する抗体または抗原の有無を検出する方法である。

【0004】 本発明者らは先に特願昭61-224567号、61-252427号、61-254164号、62-22062号、62-22063号、62-152791号、62-152792号、62-184902号としてレーザ磁気免疫測定法及び測定装置についての発明を特許出願している。これらの新しい免疫測定法は標識材料として磁性微粒子を用いて、例えば磁気標識された検体の有無を干渉縞から検出する点に特徴があり、アイソトープを用いなくてピコグラム以下の超微量検出が可能である。本発明者らは上述の特許に基づき、磁性微粒子を抗原あるいは抗体に標識し、初めて、ウイルスの検出等を行なった。

【0005】 本発明に関わる、デキストラン被覆マグネタイト粒子に関しては、米国特許第4452773号“Magnetic iron-dextran microspheres”として、Moldayの発明がある。この発明はマグネタイト微粒子を核として、その周りにデキストランを被覆し、このデキストランに、プロテインA、抗体あるいは酵素等を結合したものである。本発明者らはMoldayの特許で開示されたデキストラン被覆マグネタイト粒子の製造方法を改良し、任意の粒径の磁性微粒子が製造できる方法を発明し、先に特願平1-278221号「磁性微粒子の製造方法」、特願平2-35925号「磁性微粒子の製造方法」として特許出願した。

【0006】 さて、本発明者らは先に、Moldayあるいは本発明者らの方法で作製したデキストラン被覆マグネタイト粒子に、Moldayの開示した方法でプロテインAを結合し、該プロテインAに更にエイズウイルス(HIV)抗原、例えばP24に対するモノクローナル抗体を結合して、微量なHIV抗原の検出実験を実施し、その成果を第37回日本ウイルス学会(1989年11月)で発表した。この結果、精製したHIV抗原の場合は、0.1ピコグラム/mlの微量ウイルス抗原の検出に成功した。しかし、Moldayが開示した方法で人血清中からHIV抗原を検出する場合、プロテインAに結合した抗体が解離しやすく、デキストラン被覆マグネタイト粒子が直接マイクロビーズに結合することが生じるため、コントロール値が異常に高くなる現象が生じた。なお、コントロール値とは検体を加えない場合に検出される信号値で、いわゆる雑音である。

【0007】本発明に関わる、アビジン-ビオチン反応は公知であり、従来は核酸の非放射性標識に用いられていた。また、酵素免疫法(EIA)、蛍光標識免疫法(FIA)でも用いられていたが、本発明者らが開発してきた、磁性微粒子を標識に用いる新しい免疫測定方法では新規である。即ち、EIA法等では、ABC法として知られているように、予めビオチン化した酵素とアビジンを、酵素標識時に同時に加えることが行なわれている。

【0008】

【発明が解決しようとする問題点】本発明は前記事情に鑑みてなされたもので、実際に患者血清に適用する際に問題となる、コントロール値の低減と、安定化を図るために、非特異反応の少ない磁性微粒子標識材料及び検体調整方法を提供することを目的とする。

【0009】

【問題点を解決するための手段】本発明のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子標識材料は、デキストランが被覆されたマグネタイト微粒子であって、該デキストランの表面に、複数個のアビジン(請求項1に対応)または複数個のビオチン(請求項2に対応)を結合せしめたことを前記課題の解決手段とした。また、ビオチン結合デキストランマグネタイト粒子は、更にアビジンを該ビオチンに結合させることもできる(請求項3に対応)。この場合、アビジン-ビオチン-デキストラン-マグネタイトから磁性微粒子標識材料が構成される。該磁性微粒子標識材料は、自己凝集防止のため適当な緩衝液中に分散浮遊した状態で使用される。緩衝液としては、例えば、BSA(牛アルブミン)が1%添加されたHEPES溶液が好ましい。また、該磁性微粒子標識材料は、凍結乾燥して長期保存することができる。なお、該磁性微粒子標識材料は、デキストラン被覆マグネタイト粒子と結合していない、アビジンあるいはビオチンを完全に除去しておくことが望ましい。未反応のアビジンあるいはビオチンが残存していると、検体を該磁性微粒子標識材料で磁気標識する際に妨害するためである。

【0010】本発明の磁性微粒子標識材料の性能を発揮させるためには、以下のような検体調整方法が好ましい。

【0011】この検体調整方法は請求項4に記載のように、検出すべき抗原に対する第一の特異抗体が予め結合されたマイクロビーズ浮遊液と、検体とを反応させ、該マイクロビーズ表面に検体を捕捉せしめる第一工程と、捕捉された該検体と、予めビオチンを結合した該検体に対する第二の特異抗体とを更に反応させ、該検体を第一と第二の特異抗体とでサンドイッチする第二工程と、該第二工程後に、上記レーザ磁気免疫測定用磁性微粒子標識材料の分散浮遊液を加え、前記第二の特異抗体中のビオチンと、該磁性微粒子標識材料中のアビジンとを反応させ、該マイクロビーズに捕捉された該検体のみを磁気

標識する第三工程と、該第三工程において反応しなかった該磁性微粒子標識材料を分離・除去する第四工程とを少なくとも含むものである。

【0012】あるいは請求項5に記載のように、上記検体調整方法において、第二工程後に、アビジンを単独で加え、第二の特異抗体に結合しているビオチンにアビジンを結合させ、さらにこの第二の特異抗体中のビオチンに結合したアビジンと、請求項2に記載の磁性微粒子標識材料中のビオチンとを反応させ、該マイクロビーズに捕捉された該検体のみを磁気標識する第三工程と、該第三工程において反応しなかった該磁性微粒子標識材料を分離・除去する第四工程を少なくとも含むこともできる。

【0013】

【実施例】以下、実施例に基づき、磁性微粒子標識材料及び検体調整方法を詳しく説明する。

【0014】(実施例1)デキストラン被覆マグネタイト微粒子を以下の方法で作製した。デキストラン125g、尿素50gを1lの純水に溶解し、FeCl₃・6H₂Oを0.5g、FeCl₃・4H₂Oを0.73g添加(Fe³⁺:Fe²⁺=1:2(モル比)に相当する)して、出発溶液とし、これを密閉可能な容器、例えば、テフロン製容器にいれ、オイルバスに漬けて、100~110℃で約2時間加熱した。加熱により、尿素が分解して、アンモニアが発生し、溶液中にデキストランで被覆されたマグネタイト(Fe₃O₄)が、作製された。後の操作に適するように、この溶液を、限外濾過(フィルター:10万分子量分画用)を適用して、約8~10倍濃縮し、デキストラン被覆微粒子を含有する水溶液を得た。X線によるマグネタイト微粒子の粒径測定により、これら微粒子は、100オングストロームであることが確認された。また、動的散乱測定法を適用することによって、デキストラン被覆層を含む微粒子の平均粒径は、100nm(1000オングストローム)であり、単分散に近い粒度分布を有することも併せて、確認された。

【0015】次に、これら微粒子に、アビジンやビオチンを結合させるため、その前段階として、以下の操作を行った。上記濃縮水溶液100mlに、pH6.5に調整した酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を100ml添加し、その後、4℃まで冷却して、超音波振動を加えながら、酸化剤(NaIO₄)2gを添加し、1時間反応させた。この操作により、デキストランは、結合が一部開裂する。以下、この溶液を、酸化デキストラン被覆マグネタイト微粒子含有溶液と称する。前述した、X線や、動的散乱測定法によって、マグネタイトおよび酸化デキストラン被覆微粒子の粒径を測定したところ、マグネタイトそのものの粒径には、変化はみられなかった。また、被覆微粒子の粒径も、多少減少傾向を示すものの、(例えば、平均粒径100nmが、95nmに変化)概

ね同様の値に留まっていた。酸化処理後、余分のNaIO₃等を除去し、同時にさらに濃縮するため、再度、限外濾過を適用し、4倍～5倍に濃縮した。このため最初微粒子を作製した時と比較すると約20～30倍濃縮されたことになる。このように高い濃度は、次にアビジンや、ビオチンを付加する時、その付加できる割合を高めるため必要とされるものである。

【0016】このようにして作製した酸化デキストラン被覆マグネタイト微粒子を原料として、以下で説明する3種類の本発明のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子標識材料を得た。

【0017】(1)アビジン結合デキストラン被覆マグネタイト微粒子の作製法。(請求項1に対応)

【0018】酸化デキストラン被覆微粒子溶液1mlに、ほう酸-ほう砂緩衝液(pH7.5～8.5の間の値を選択してよい。)1mlを添加後、アビジン数mgを加えて1～2時間振とうさせながら付加反応を進行させた。これを1晩4℃で保存し、その後、数mgのNaBH₄を4℃で添加して還元処理を行った。HEPES緩衝液で、さらに1晩透析をおこなって余分な還元試薬を除去した。付加反応に関与しなかったアビジン(フリーのアビジンと呼ぶ)は、この後遠心またはゲル濾過によって除き、アビジン結合デキストラン被覆マグネタイト微粒子を作製した。

【0019】(2)ビオチン結合デキストランマグネタイト微粒子の作製法。(請求項2に対応)

【0020】酸化デキストラン被覆微粒子溶液1mlに、バイカルボネート緩衝液(NaHCO₃+Na₂CO₃)(pH8.5)1mlを添加してpH調整を行った後、これにDMF(ジメチルフォルムアミド)に溶解したビオチンヒドラジドを添加(例えば、10mg/mlビオチンヒドラジドを0.1ml添加)し、室温で1時間振とうして1晩4℃に保存した。これに4℃でNaBH₄を添加して還元処理を行い安定させ、HEPESで1晩透析してフリーなビオチンを除去した。このようにしてビオチン結合デキストランマグネタイト微粒子を作製した。

【0021】(3)アビジン-ビオチン結合デキストラン被覆マグネタイト微粒子の作製法。(請求項3に対応)

【0022】上述の方法で作製したビオチン結合デキストランマグネタイト微粒子溶液にアビジン試薬を添加し、アビジン-ビオチン反応を起こさせ、フリーのアビジンを遠心またはゲル濾過で除去することにより、アビジン-ビオチン結合デキストラン被覆微粒子を作製した。

【0023】(実施例2)アビジンやビオチンをデキストラン被覆マグネタイト微粒子に付加した後、必ずフリーのアビジンや、フリーのビオチンを、なんらかの方法で除去することが、これらアビジン(または、ビオチ

ン)結合マグネタイトを、検出に用いる際重要となる。一方、発明者らの実験によって遠心やゲル濾過の処理を施す事により、結合したアビジンやビオチンとデキストランの一部が剥離することが明らかになった。このため剥離しづらい結合形態を採用する必要が生じた。これらのことを実施例2として以下に示す。

【0024】図1はアビジン結合デキストラン被覆マグネタイト微粒子(アビジン-マグネタイトと略記する)及びビオチン結合デキストラン被覆マグネタイト微粒子(ビオチン-マグネタイトと略記する)を遠心処理した時、付与した遠心力に対して、最初に結合していたアビジン(またはビオチン)の何%が遠心後、残存しているかを示したものである。具体的には、遠心処理後上清液に含有されているアビジン(またはビオチン)の濃度を測定して最初の値から差し引いて残存量とした。アビジンの濃度は、280nmのタンパク質の吸収から、また、ビオチンの濃度はHABA-アビジン複合体を用いるビオチン分析法によって分析したものである。この結果から、ビオチン-マグネタイトはアビジン-マグネタイトに比べて著しく剥離が進行することがわかる。アビジン-マグネタイトでは、この程度の剥離は後の使用に対しては実用上問題とはならない(通常フリーのアビジンを除去する際の回転数は16000rpmである)。ビオチン-マグネタイトでは、この微粒子そのものの不安定を反映しているものと考えられ、使用に際して注意が必要になる。

【0025】遠心よりはマイルドな分画と考えられるゲル濾過法(ゲル:ファルマシア社セファクリルS-1000使用)によって、フリーのアビジンやビオチンを除去した時の結果を図2に示す。図2のマグネタイトの曲線は、鉄の化学分析によって測定した値を溶出量に対してプロットしたものである。また、図中グリセロールとして矢印で示したのは、比較的分子量の小さなもの(MW:92)として、その溶出の位置を明かにするために添加した試薬である。図中にアビジンの例を示してあるが、きれいにフリーのアビジンが除かれていることがわかる。一方、ビオチンはフリーのビオチン溶出のピークの後も延々と溶出が続き、グリセロールの位置よりさらに低分子量域にも溶出を示している。この現象は通常起こらないことである。考えられるのは、ゲルを通過する間にもビオチンまたはデキストランの一部が剥離しているということである。

【0026】次に、ビオチン-マグネタイトにアビジンを反応させ、そのあとでフリーのアビジンを除去した時の結果を図3に示す。この場合は、一応フリーのアビジンが除去され、ビオチンの剥離はさらに付加したアビジンによって防止されていることがわかった。

【0027】さらに図4に、投入したアビジン量に対して結合したアビジン量を示した。これは、ゲル濾過(ゲル:ファルマシア社セファクリルS-300)を行いフ

リーのアビジン量を測定し、投入量から差し引いて求めたものである。アビジン-マグネタイトに比較して、アビジン-ビオチン-マグネタイトの場合は有効に結合するアビジンの量が著しく少ないことが認められる。

【0028】本発明者らの引続き行った実験によって、これら3種類のマグネタイト、すなわちアビジン結合デキストラン被覆マグネタイト、及びアビジン-ビオチン結合デキストラン被覆マグネタイト、及びビオチン結合デキストラン被覆マグネタイトは、すべて後の検出実験で成功裡に用いることができた。しかし、試薬の有効利用や微粒子の安定性を考えると、最も望ましいのはアビジン結合デキストラン被覆マグネタイトであると言うことができる。

【0029】本発明者らによる、上述した遠心法とゲル濾過法を用いたフリーなビオチン、アビジンの除去方法の研究から得られた知見を基にすると、ビオチン結合デキストラン被覆マグネタイトの場合は、フリーなビオチンを除去する際遠心やゲル濾過のような外力をかける方法ではなく、実施例1で述べた透析法で行なうことが望ましい。また、ビオチン結合デキストラン被覆マグネタイトをアビジン-ビオチン結合デキストラン被覆マグネタイトとして用いる場合は、フリーなビオチンを予め除去する工程は省略し、アビジン添加後フリーなビオチンとアビジンを同時に除去する方法を取ることもできる。

【0030】(実施例3) 実施例1の方法で作製した本発明の磁性微粒子標識材料をインフルエンザウイルスの抗原検出に適用した。詳細は以下の通りである。

【0031】検体調整方法(請求項4に対応): ショ糖密度勾配遠心法により精製した、既知濃度のB型インフルエンザウイルス(B/Chaling Rai/3/85)を正常人血清で希釈し、ウイルス濃度100個/mlに調整した。

【0032】粒径2 μ mのアクリル樹脂製マイクロビーズ(トレスフェア、東レ株式会社)を活性化した後、抗インフルエンザウサギ血清と35℃で30分反応させ、PBSで洗浄後、1%BSA-PBSの0.2%マイクロビーズ浮遊液を調整した。この調整によりマイクロビーズ表面にはインフルエンザ抗体(第一の特異抗体)が固定化される。

【0033】前記インフルエンザウイルス浮遊液25 μ lと前記マイクロビーズ浮遊液25 μ lを35℃で2時間反応させ、インフルエンザウイルスをマイクロビーズ表面に捕捉する。

【0034】予めビオチンを結合した、ビオチン化抗体(第二の特異抗体)0.1mg/mlを10 μ l加え、35℃で1時間反応させる。この後、未反応のビオチン化抗体を遠心法でB/F分離する。

【0035】更に、本発明の磁性微粒子標識材料0.1mg/mlを10 μ l加え、35℃で30分反応させ

る。反応後、未反応の磁性微粒子標識材料を遠心法でB/F分離する。沈殿したマイクロビーズを25 μ lのHEPES緩衝液で再浮遊させた後、測定に用いる。

【0036】以上の検体調整工程でウイルスが磁気標識される模式図を図5に示す。(a)は抗原捕捉工程、(b)はビオチン化抗体反応工程、(c)は磁性微粒子標識材料反応工程における結合状態を示す。この図5では、磁性微粒子標識材料としてアビジン結合デキストラン被覆マグネタイト微粒子の例を示しているが、アビジン-ビオチン結合デキストラン被覆マグネタイト微粒子でも全く同様である。即ち、いずれの場合でも磁性微粒子標識材料は表面にアビジンが結合しているから、公知のアビジン-ビオチン反応でウイルスと結合したビオチン化抗体と特異的に結合することができる。このようにしてマイクロビーズに捕捉されたウイルスが磁気標識される。

【0037】一方、磁性微粒子標識材料としてビオチン結合デキストラン被覆マグネタイト微粒子を用いる場合は(請求項5に対応)、上記検体処理法において、予めビオチンを結合した、ビオチン化抗体(第二の特異抗体)を加えて反応させ、未反応のビオチン化抗体を遠心法でB/F分離した後に、アビジンを単独に加え、ウイルスと結合したビオチン化抗体にアビジンを結合させた後ビオチン結合デキストラン被覆マグネタイト微粒子を反応させればよい。

【0038】検体測定法: 特願昭62-184902号「レーザ磁気免疫測定方法及び装置」で発明した干渉法による測定で実施した。

【0039】純水350 μ lが注入された検査容器のウエルに、検体調整の終わった検体25 μ l全量を入れる。

【0040】傾斜磁界発生装置の中に検査容器を挿入し、約8kガウスの磁界をかけウエル水面の1点に検体を磁気濃縮する。

【0041】この濃縮点に5mWのHe-Neレーザを入射角30度で斜めから照射し、反射光束中の干渉縞を白色スクリーンで受け、CCDカメラ、画像処理装置により干渉縞の中心光強度を測定する。

【0042】結果: 下記、表1に3種類の磁性微粒子標識材料を用いた本発明の方法における、ウイルス100個/mlと陰性コントロールの干渉縞中心光強度の値を示した。

【0043】なお、陰性コントロールとは免疫検査の分野で必ず実施されるものであって、検体を加えない対照試料に対するネーミングである。この対照試料には検体と同様な操作が同時期に施されている。陰性コントロール値は低いほど好ましい。

【0044】

【表1】

	磁性微粒子標識材料	干渉鏡中心強度	
		ウイルス 100個/ml	コントロール
本 発 明	(イ) アビジン結合デキストラン マグネタイト微粒子	80	20
	(ロ) アビジン-ビオチン結合 デキストランマグネタイト 微粒子	76	23
	(ハ) ビオチン結合 デキストランマグネタイト 微粒子	61	29
比 較 例	インフルエンザ抗体-プロテ ィンA結合デキストラン被覆 マグネタイト微粒子	65	55

【0045】比較例は、本発明者らが以前に実施し、例えば第37回日本ウイルス学会総会（1989年11月大阪、講演番号439）で発表した方法によって、インフルエンザ抗体-プロテインA結合デキストラン被覆マグネタイト微粒子を用いた場合の結果である。この表1より、本発明の方が比較例と比べ陰性コントロール値が低く、ウイルス濃度100個/mlが確実に検出できることが認められた。

【0046】

【発明の効果】以上詳述のように、本発明のレーザ磁気免疫測定に用いられる磁性微粒子標識材料を用いればマイクロビーズへの非特異吸着が生じにくいため、人血清中でも陰性コントロールが低く安定である。この理由は、本発明者らが先に発明したデキストラン被覆マグネタイトに直接抗体を結合する方法と比較すると、本発明の場合アビジン-ビオチン反応で検体が磁気標識されるから、従来の抗原抗体反応で磁気標識される場合よりも反応時間が大幅に短縮できる。前記実施例3では磁気標識反応時間を30分としたが15分でも充分である。非特異反応は、一般に時間が長いほど生じ易いから、本発明のアビジン-ビオチン反応を利用するのが非特異反応を抑制するのに有利である。

【0047】更に、本発明の材料は対象とするウイルスが変わっても、同一の材料が使用できるから汎用性がある。即ち、従来のデキストラン被覆マグネタイトに直接抗体を結合する方法の場合、ウイルス毎に磁性微粒子標識材料を用意する必要があった。しかしながら本発明の場合においては、ビオチン化抗体をウイルス毎に用意す

るだけでよい。この相違点は、診断薬として実用化する際に極めて効果が著しいものである。また、実際に診断薬を製造する際にも極めて効果がある。なぜならば、本発明者らの経験によればデキストラン被覆マグネタイトに直接抗体を結合する場合、抗体の種類、性質が変われば出来上がった磁性微粒子標識材料（磁気標識試薬と称する）の抗体価、凝集性が変わり、試薬としての経時安定性、特に凝集性が非常に変化する。そのため、多種類の磁気標識試薬を製造するためには長い開発期間と費用を要する。この点が従来の酵素免疫測定法における酵素標識試薬に比べ磁気標識試薬の特有の問題点であった。一方、ビオチン化抗体の場合は、磁気標識試薬と比べ多種類のものを作製することは非常に簡単であって、実際に種々のビオチン化抗体が市販されている。

【0048】以上のように、本発明の方法を用いれば汎用性の高い試薬が提供できる。

【0049】ところで、アビジン-ビオチン反応を用いたEIA法の場合、酵素にはビオチン（分子量=244）が結合されている。この理由は、これら標識材料の分子量が小さいため、分子量が大きいアビジン（分子量=66000）の結合が不利なためである。本発明の磁気標識試薬の場合、実施例2で述べたように分子量の大きなアビジンをデキストランに結合させる方が、ビオチンを結合させるよりも磁気標識試薬が安定になり有利である。このように、アビジン-ビオチン反応そのものは公知であったが、これを磁気標識試薬に適用した場合、検出感度の向上のみならず試薬の安定性の向上も併せて図れることが本発明者らの研究から初めて明らかになっ

た。

【0050】さて、インフルエンザウイルスの場合従来の血球凝集法ではウイルス濃度が1千万個/ml以上なければ検出できなかったが、本発明の材料を用いて本発明の方法によれば、従来の10万倍の高感度でウイルスの検出が可能になった。現在、本発明者らはHIV（エイズウイルス）抗原の高感度検出の研究を進めているところであるが、エイズ患者の血清から0.1ピコg/mlの極微量のp24コア抗原の検出にも成功している。従って、ウイルス培養せずに患者から直接ウイルスの検出が出来るから各種感染症の早期診断にきわめて有効である。なお、本発明の方法は実施例で述べたウイルス抗原検出に限られるものではなく、現在広く実施されている抗体検査にも適用できる。抗体検査に適用した場合、検出感度が高い特徴を活かして、例えば血液中で抗体量の少ないIgE抗体の検出が短時間で可能になるからアレルギー診断に適用できる。

【0051】さらに抗原抗体反応のみに止まらず、従来RIA法が適用されていたペプチドホルモン等の種々のホルモンあるいは種々の酵素、ビタミン、薬剤などの測定にも応用することが可能である。従って、従来は限定された施設でRIA法によらなければ実施できなかった精密な測定を、一般的な環境で広く迅速に実施すること

が可能となる。集団検診等のような一般的な状況で、各種のウイルス、癌等のスクリーニング検査等の精密な測定が広く実施できれば、癌あるいはウイルス性疾患等の早期診断が可能となり、有効な早期治療を的確に実施することが可能となる。このように、本発明が医薬・医療の分野で果たす効果は計り知れない。

【図面の簡単な説明】

【図1】アビジン-マグネタイト及びビオチン-マグネタイトを遠心処理した時、付与した遠心力に対するアビジン（またはビオチン）の残存%を示すグラフである。

【図2】ゲル濾過法によるアビジン-マグネタイト及びビオチン-マグネタイトの溶出曲線である。

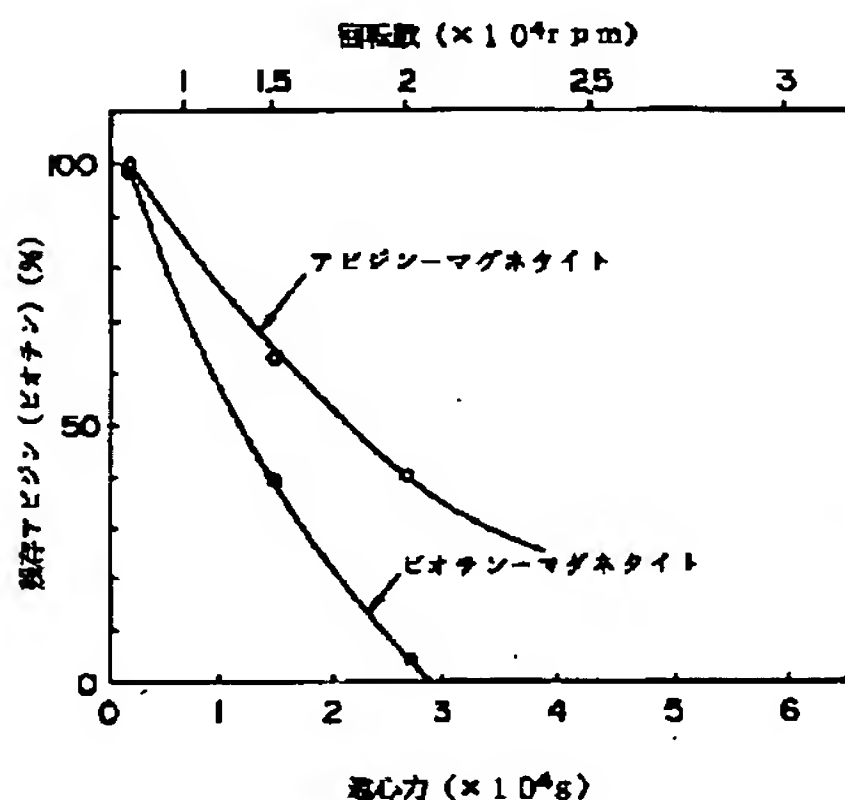
【図3】ビオチン-マグネタイトにアビジンを反応させた後の、フリーのアビジン及びマグネタイトの溶出曲線である。

【図4】アビジン-マグネタイト及びアビジン-ビオチン-マグネタイト作製時の投入アビジン量と結合アビジンの関係を示すグラフである。

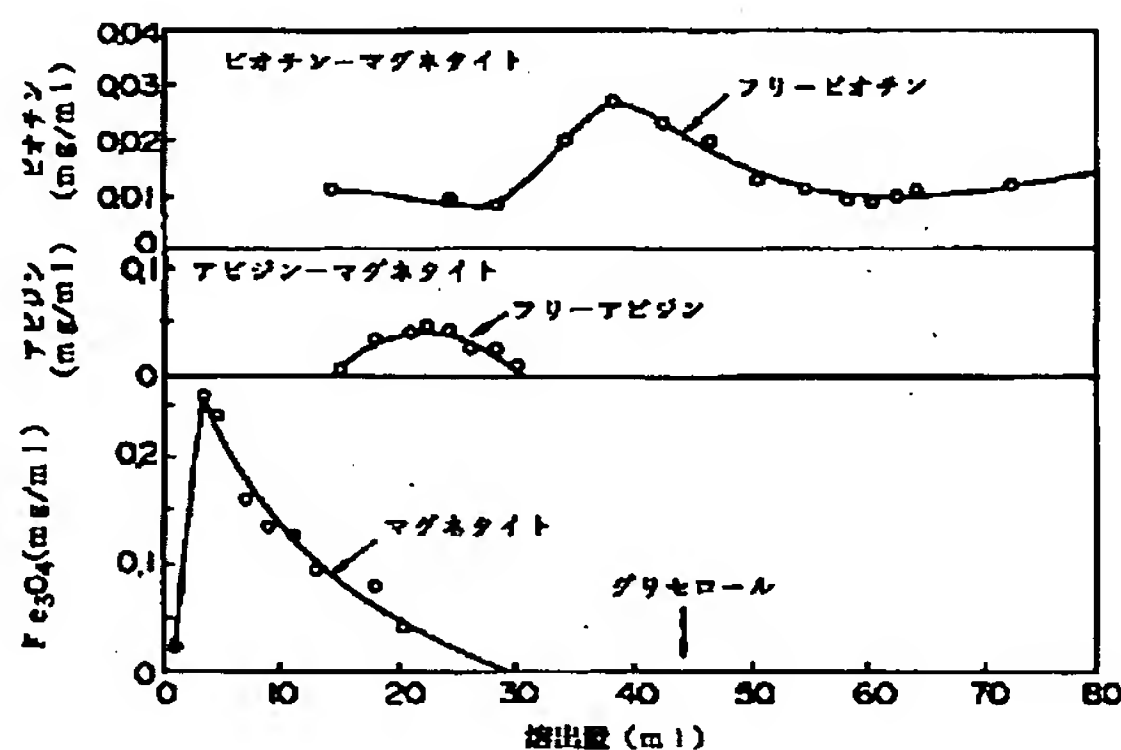
【図5】本発明の第3の実施例において、検体調整工程でウイルスが磁気標識される結合状態の模式図であり、

(a)は抗原捕捉工程、(b)はビオチン化抗体反応工程、(c)は磁性微粒子標識材料反応工程における結合状態を示すものである

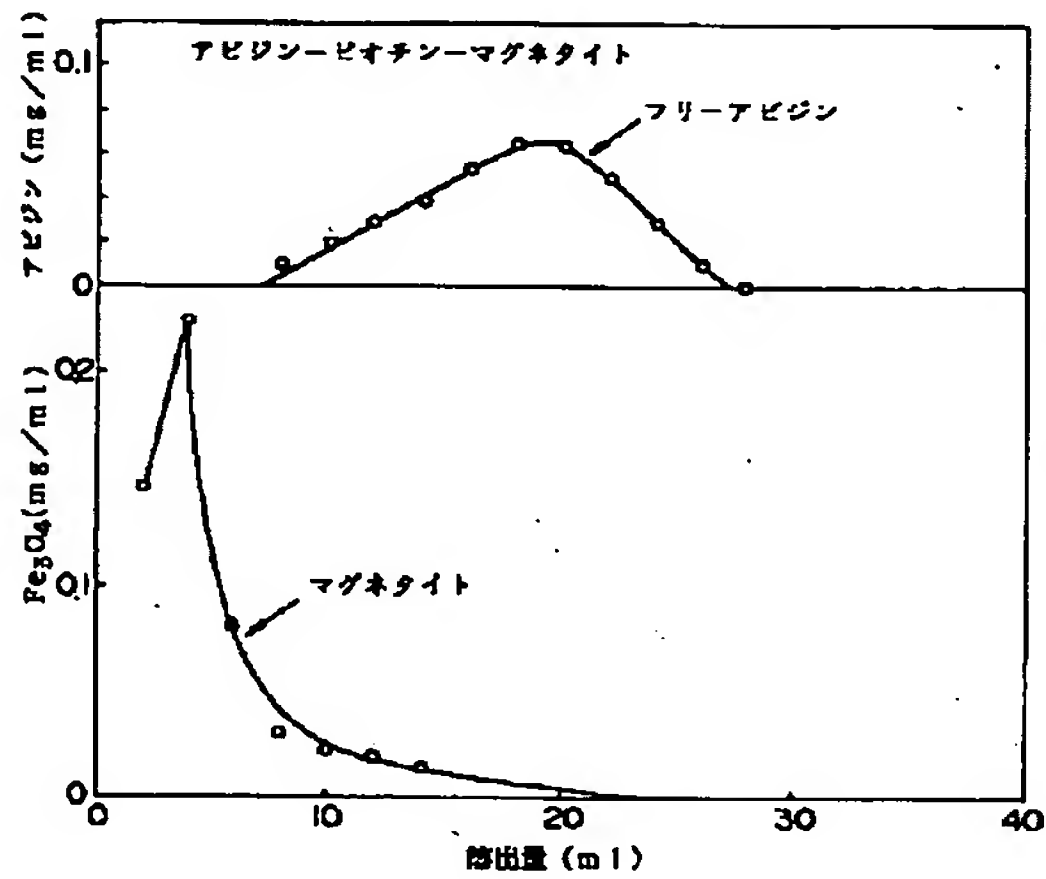
【図1】



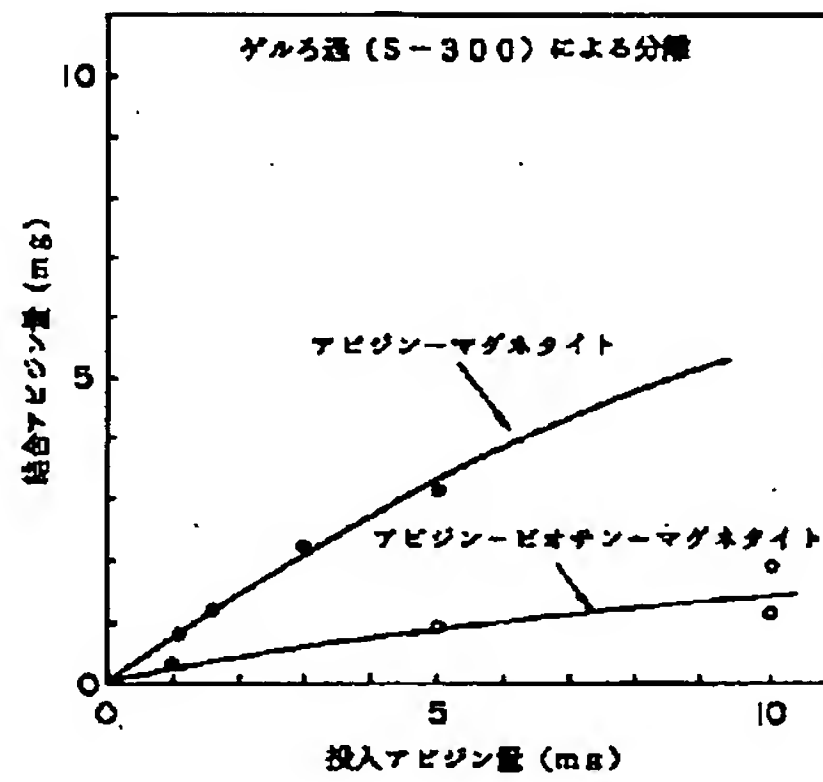
【図2】



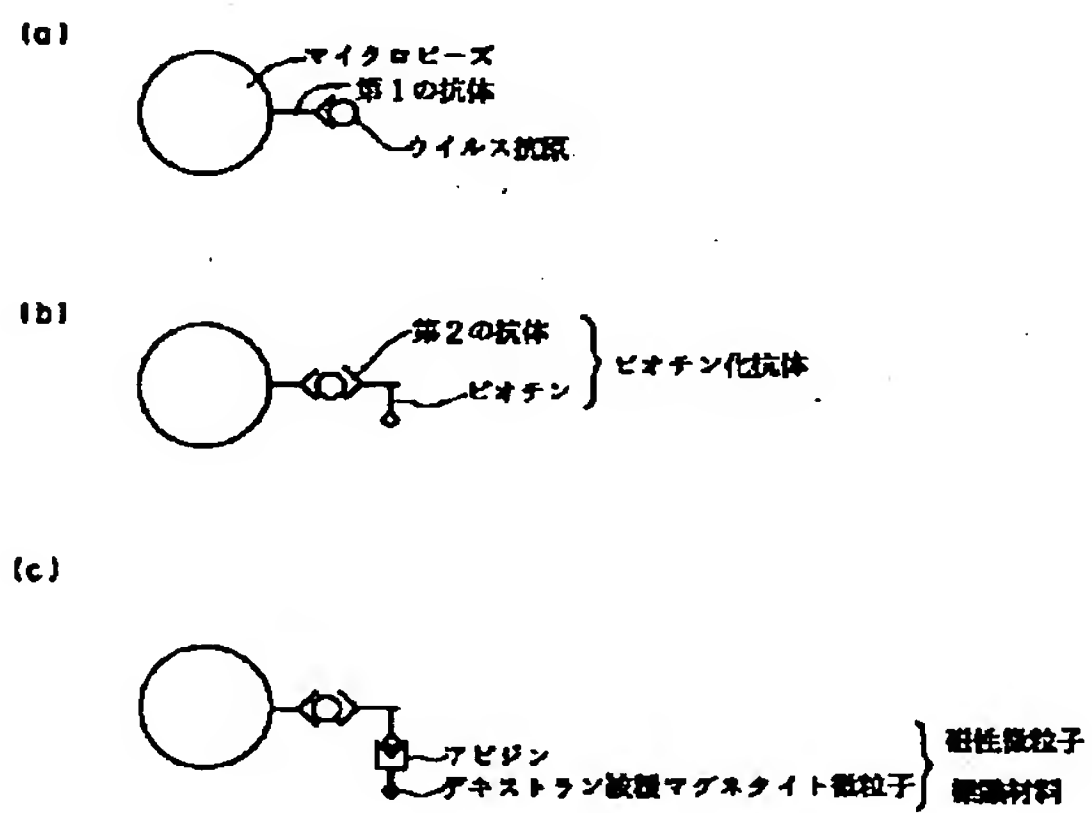
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 星野 光利
東京都千代田区内幸町一丁目1番6号 日
本電信電話株式会社内

(72)発明者 水谷 弘子
東京都渋谷区宇田川町6番11号